ZUM NACHWEIS VON STOFFWECHSELBEEINFLUSSENDEN FAKTOREN AN ORGANEXPLANTATEN

Werner Zintl

1961

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

ZUM NACHWEIS VON STOFFWECHSELBEEINFLUSSENDEN FAKTOREN AN ORGANEXPLANTATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Werner Zintl

aus Floß/Obpf.

München 1964

G. Bauknecht, Dissertations-Druckerei, München 9, Birkenleiten 35, Tel. 498041

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. H. WRBA
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Professor Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.1964

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT
GEWIDMET

GLIEDERUNG

		Seite
A	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
B	MATERIAL UND METHODEN	8
I	Parabiose	8
II	Technik der Hepatektomie	8
III	Technik der Renektomie	8
IV	Gewinnung der Organexplantate	9
V	Rollerkulturmethode	9
VI	Gewinnung von Organhomogenat	10
VII	Gewinnung von Tumorexplantaten	10
VIII	Herstellung von Hypophysenhomogenat	10
C	VERSUCHSERGEBNISSE	11
I	Zur Persistenz humoral induzierter Wachstumsvorgänge im Explantat	11
II	Wirkung von Organhomogenat auf Organexplantate	12
	α) Auf Leberexplantate	12
	1) Wirkung von normalem Leberhomogenat und Homogenat regenerierender Leber auf embryonale Leberexplantate	
	2) Wirkung von Homogenat aus Lebern von Ratten 44 Stunden nach Renektomie im Vergleich zu normalem Leberhomogenat	
	3) Wirkung von Homogenat aus Lebern von Ratten 54 Stunden nach Darmunterbindung und 54 Stunden nach i. p. Injektion von Pyrifer	
	4) Suche nach einem brauchbaren Vergleichswert.	
	β) Auf Tumorexplantate	22
	1) Wirkung von Normal- und Hepatektomieleberhomogenat auf explantierten Tumor	
	2) Wirkung von Nierenhomogenat von normalen und renektomierten Ratten auf explantierten Tumor	
III	Wirkung von Hypophysenhomogenat von vorbehandelten und normalen Ratten auf Organexplantate	24
	1) Wirkung von Hypophysenhomogenat von normalen	

Ratten und solchen, die vor 48 Stunden teilhepatektomiert worden waren auf Explantate aus Leber neugeborener Ratten

2) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten und solcher, die vor 72 Stunden renektomiert worden waren auf Explantate aus Leber neugeborener Ratten

3) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten und solcher, die vor 48 Std. teilhepatektomiert worden waren auf Explantate aus Leber neugeborener Ratten
(Homogenat erhitzt und nicht erhitzt)

4) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten und solcher, die vor 48 Std. hepatektomiert worden waren auf Explantate aus Niere neugeborener Ratten

5) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten und solcher, die vor 24 Std. -6 Tagen renektomiert worden waren auf Explantate aus Niere neugeborener Ratten.

6) Einfluß anderer Eingriffe in den Organismus von Ratten auf die Bildung eines stoffwechselsteigernden Faktors in der Hypophyse

D DISKUSSION DER ERGEBNISSE 29

E ZUSAMMENFASSUNG 34

LITERATURVERZEICHNIS 36

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die operative Entfernung eines Anteiles der Leber bei Versuchstieren löst einen Regenerationsvorgang in diesem Organ aus.

Dieser Wachstumsvorgang in einem ausdifferenzierten erwachsenen Organ wird von einem im Serum des betreffenden Tieres nachweisbaren "Regenerationsfaktor" begleitet.

CHRISTENSEN und JACOBSON (1) konnten 1950 als erste den Nachweis erbringen, daß im Serum von partiell-hepatektomierten Ratten ein spezifisch auf die Leber stimulierend wirkender Faktor vorhanden sein muß. Nach operativer Entfernung von 2/3 Lebergewebe bei einem von zwei Parabiosepartnern fanden sie einen Anstieg der Mitosenzahl in der Leber des unbehandelten Parabionten. Dieser Befund wurde inzwischen mehrfach bestätigt.

BUCHER, SCOTT und AUB (2) fanden bei Parabiosezwillingen eine 6-fache, bei Parabiosedrillingen - zwei Tiere wurden jeweils partiell-hepatektomiert - sogar eine 50-fach gesteigerte Mitosenzahl in der Leber des unbehandelten Parabiosepartners.

FRIEDRICH-FREKSA und ZAKI (3) konnten 1954 den schlüssigen Beweis dafür liefern, daß der spezifisch auf die Leber wirkende mitosesteigernde Faktor im Blut des partiell-hepatektomierten Tieres vorhanden ist, indem sie eine 40-fache Steigerung der Mitoserate in Lebern normaler Ratten nach einmaliger i.v. Injektion von Serum teil-hepatektomierter Ratten erreichten, während sich normales Rattenserum als völlig wirkungslos erwies.

1960 gelang WRBA, RIPOLL-GÓMEZ und RANZ (4) der Nachweis, daß das Serum teil-hepatektomierter Ratten auf die in Gewebekultur explantierte embryonale Rattenleber stimulierend wirkt.

Serum von Ratten, das 48 Stunden nach Teilhepatektomie gewonnen worden war, dem Nährmedium der Gewebekultur zugesetzt, führte zu einem signifikanten Anstieg des inkorporierten radioaktiven Phosphates in den Explantaten, im Vergleich zu solchen, denen normales Rattenserum zugesetzt worden war. Damit war ein bedeutender Fortschritt gemacht: Jetzt war es möglich, Wechselbeziehungen solcher Art am unabhängigen System zu untersuchen, d.h. nachdem die humoralen und nervalen Einflüsse des Organismus ausgeschaltet waren. Außerdem war eine Methode gefunden, Ergebnisse genauer zu objektivieren, als dies mit der Methode des Auszählens von Mitosen unter dem Mikroskop möglich war.

Die Menge des aufgenommenen $P^{32}O_4$ liefert einen genauen Maßstab für das Ausmaß der Phosphorylierungsvorgänge in den Explantaten.

Mit Hilfe dieser neuen Methode ergaben sich unter anderem folgende Resultate (5):

1.) Die Phosphorylierungsaktivität embryonaler Leberexplantate übersteigt mit +138 % die von erwachsener Leber.

2.) Explantate regenerierender Leber (48 Stunden nach Teilhepatektomie) zeigen mit +134 % eine Phosphorylierungsaktivität, die der embryonalen sehr nahe kommt.

3.) Der Regenerationsablauf läßt sich zeitlich verfolgen:

6	Std.	nach	Teilhepatektomie	:	Depression um	-32 %
24	"	"	"	:	Steigerung "	+35 %
48	"	"	"	:	" "	+83 %
72	"	"	"	:	" "	+64 %
96	"	"	"	:	" "	+10 %
192	"	"	"	:	" "	+20 %

Unsere Fragestellung bezog sich auf den Entstehungsort des "Regenerationsfaktors" bei der Hepatektomie, seinen Angriffspunkt und die eventuell synergetische Wirkung mit Faktoren endokriner Organe.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. PARABIOSE

Wir verwendeten Sprague-Dawley-Ratten gleichen Geschlechts und von nahezu gleichem Gewicht. In der Operationstechnik folgten wir den Angaben von PFEIFFER [6]: Nach intraperitonealer Applikation von Avertin (einmalige Injektion von 0,6 - 0,9 ml von 3 % Avertin), wurden zwei Tiere an ihrer Flanke in einer Länge von 7 - 10 cm in allen Hautschichten vereinigt. Um ein Zerren an der Wundnaht zu verhindern, wurden Klammern und zwei Entlastungsnähte in Schulterhöhe angelegt. Vereinigt wurden nur relativ junge Tiere von ca. 150 g, da sich diese wesentlich besser an die Parabiose gewöhnen als ältere.

II. TECHNIK DER HEPATEKTOMIE

Die Ratte wurde auf der Bauchseite geschoren und mit Alkohol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen und in Äthernarkose wurde ein ca. 4 cm langer Schnitt entlang der linea alba bis zum proc. ensiformis des sternums angelegt. Nach Durchtrennen ihrer mesohepatica und Abbinden des großen ventralen und rechten Lappens am hilus wurden beide Lappen entfernt. Muskulatur und Haut wurden anschließend getrennt mit fortlaufender Naht verschlossen. (Die resezierten Lappen stellen ca. 60 % des gesamten Lebergewichtes dar).

III. TECHNIK DER RENEKTOMIE

Ein 2 cm langer Schnitt wurde nach Vorbereitungen wie bei der Hepatektomie 1/2 cm parallel unterhalb des linken Rippenbogens angelegt. Nach Beiseiteschieben der Milz wurde die Niere nach Anheben mit breiter anatomischer Pinzette unter

Schonung der Nebenniere aus ihrer Kapsel gelöst, am hilus unterbunden und entnommen. Verschluß wie bei der Hepatektomie.

IV. GEWINNUNG DER ORGANEXPLANTATE

Die Tiere wurden beim Töten völlig entblutet und das jeweilige Organ steril entnommen. Unter aseptischen Bedingungen wurden dann auf einer Glasplatte, die in der Mitte mit Hanks-Salzlösung benetzt war, aus Parenchymgebieten mit feinen Skalpellen ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten, diese wieder in ca. 1 mm breite Streifen und diese Streifen schließlich in kleine Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge, die man zur Aufbewahrung in eine Petrischale gab. (Während des ganzen Arbeitsganges befindet sich das Gewebe ständig in isotonischer Salzlösung).
Für jeden Versuch wurden nun 18 Würfelchen aus einer Petrischale herausgefischt und in einem kleinen Glashütchen, in das vorher 0,5 ml Hanks-Salzlösung pipettiert worden waren, gewogen. (Jede Wägung vor und nach Zugabe der Explantate). Jeder Arbeitsgang muß dabei in der gleichen Zeitdauer stattfinden, da während der 3 Minuten immer eine gewisse Menge Hanks-Salzlösung aus dem Hütchen verdunstet.
Für die unten angegebene Rollermethode liegt das günstigste Explantatgewicht bei 1 mg.
Endlich wurden die Teilchen mit den 0,5 ml Hanks-Salzlösung aus den Hütchen in die Rollerröhrchen (siehe unten) abpipettiert.

V. ROLLERKULTURMETHODE

WRBA und RABES [7] untersuchten die verschiedenen Methoden der Gewebekultur. Sie fanden, daß sich für die Bestimmung der Aufnahme markierter Stoffe durch Organexplantate die Kulturmethode im schnellen Roller am besten eignet:
In einem Kulturröhrchen von der Form eines Reagenzglases mit eingeschliffenem Glasstöpsel befinden sich 18 Gewebestücken (siehe oben) nahezu gleichen Gewichtes von 1 mg in 4 ml flüssigem Medium von nachfolgender Zusammensetzung suspendiert.

Medium:
- 20 % Kälberserum
- 10 % Hühnerembryonalextrakt
- 70 % Hanks-Salzlösung
- 1 µC $P^{32}O_4$ (4 ml Medium)
- 3000 E Penicillin.

Die Röhrchen werden dann waagrecht in die Bohrungen einer Trommel gesteckt, die sich mit 300 U/min um ihre horizontale Achse dreht. Die Trommel befindet sich in einem Brutschrank mit der konstanten Temperatur von 37 °C. In dieser Anordnung werden die Explantate ständig von Medium umspült und kommen aber andrerseits auch mit der überstehenden Luft in Berührung.

Der Roller lief im Durchschnitt 20 - 24 Stunden. Danach wurde das über den Explantaten stehende Nährmedium abpipettiert und verworfen, die Gewebeteilchen

dann 3 mal mit jeweils 5 ml isotonischer Hanks-Salzlösung gewaschen, um die an der Teilchenoberfläche haftende Radioaktivität in Form von $P^{32}O_4$ zu entfernen. Anschließend wurden die Explantate in 1,5 ml Hanks-Salzlösung suspendiert und in ein Schälchen abpipettiert. Von hier wurden sie mit feinen Messerchen einzeln entnommen und zu je dreien auf 6 kleine Bleche aufgepflanzt, 4 Stunden lang bei 140°C getrocknet und dann wurde die Aktivität von je dreien 1 Minute lang mit dem Geigerzählrohr gemessen.

VI. GEWINNUNG VON ORGANHOMOGENAT

a) Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet. Man öffnete den Thorax und entblutete das Tier mit einem Scherenschlag durch das Herz. Dann wurde das Abdomen eröffnet und unter sterilen Bedingungen Leber oder Niere entnommen. Normale und regenerierende Leber (48 Stunden nach Teilhepatektomie) oder normale und hypertrophierte Niere (44 Stunden nach einseitiger Nephrektomie) wurden 15 Minuten lang im Flügelhomogenisator unter Eiskühlung mit Zusatz der gleichen Menge Hanks-Salzlösung homogenisiert. Danach wurde das Homogenat in mehreren Versuchen 45 Minuten lang bei 30 000 U/min unter Kühlung ultrazentrifugiert, der Überstand dann auf bestimmte Konzentrationen verdünnt und den Organkulturen zugesetzt.

b) Beim Erhitzen des Homogenats im siedenden Wasserbad mußte folgender Kunstgriff [10] angewendet werden: Die Hitzekoagulierung und damit das möglicherweise Mitreißen der entscheidenden Substanz bei der Gerinnung des im Homogenat enthaltenen Eiweißes wurde durch Verdünnung des Breies mit destilliertem Wasser verhindert. Anschließend wurde die physiologische Konzentration wieder durch Zusatz von Hanks-Stammlösung herbeigeführt.

VII. GEWINNUNG VON TUMOREXPLANTATEN

Verwendung fanden Rattenimpftumore. Art und Alter der Tumore finden sich in den Tabellen bei den Versuchsergebnissen angegeben.

Die Explantate stammten aus parenchymatösen, makroskopisch intaktem Gewebe und wurden wie die anderen Gewebeteilchen (B IV) geschnitten und gewogen.

VIII. HERSTELLUNG VON HYPOPHYSENHOMOGENAT

In Äthernarkose wurden die Ratten nach breiter Eröffnung des Thorax durch Scherenschlag ins Herz entblutet.

Die Hypophyse gewannen wir auf folgende Weise:
Ein 3 - 4 cm breiter Hautstreifen wurde bis zum Unterkiefer hochpräpariert. Nun trennten wir die Wirbelsäule durch einen Scherenschlag vom Schädel ab, gingen mit dem spitzen Scherenblatt in das Hinterhauptsloch ein und durchschnitten beiderseits die Schädelkalotte bis zum Kieferwinkel. Nun ließ sich die Schädelbasis aufklappen. Die Hypophyse konnte aus der sella turcica (das infundibulum wurde

beim Aufklappen durchrissen), nachdem man die umgebende dura mater entfernt hatte, mit einer sterilen Nadel entnommen werden, während das Gehirn in der Schädelkalotte blieb.

Die Hypophyse wurde anschließend in 2,5 ml Hanks-Lösung im kleinen Stabhomogenisator 5 Minuten lang unter Eiskühlung homogenisiert und auf die in den Tabellen angegebenen Werte gebracht, die immer die Konzentration in 4 ml Medium bedeuten.

C. VERSUCHSERGEBNISSE

I. ZUR PERSISTENZ HUMORAL INDUZIERTER WACHSTUMSVORGÄNGE IM EXPLANTAT

Seit 1950 bekannt und inzwischen mehrfach bestätigt (siehe Einleitung) ist die Tatsache, daß in Parabiose lebende, teilhepatektomierte Ratten auf dem Blutwege dem unbehandelten Tier Faktoren zuführen, die auch dort leberzellmitosesteigernd wirken.

Diese Parabioseversuche wandelten wir in folgender Form ab: Für jeden Versuch wurden vier gleichgeschlechtliche Ratten von annähernd gleichem Gewicht, wie unter B genauer ausgeführt, zu 2 Parabiosepaaren operativ vereinigt. Nach 4 Tagen - der Blutkreislauf zwischen beiden Partnern ist mit Sicherheit anastomosiert [9] - wurde ein Partner teilhepatektomiert. Nach 48 Stunden wurden beide Paare getötet und die vier ausgebluteten Lebern in 4 Kulturröhrchen explantiert. Nach einer durchschnittlichen Kulturdauer im schnellen Roller von 24 Std. wurden die Explantate in der üblichen Weise dem Nährmedium entnommen, gewaschen, getrocknet und die aufgenommenen Phosphataktivitäten gemessen.

Es ergab sich, daß explantierte Lebern von Ratten, die mit teilhepatektomierten Tieren parabiotisch vereinigt waren, auch noch in vitro eine deutliche Steigerung ihres Stoffwechsels zeigen (Tabelle 1). Damit ließ sich zeigen, daß eine durch den humoralen, mit dem Blut kreisenden Stimulationsfaktor während der Parabiose determinierte Wachstumssteigerung des normalen Organes auch dann fortbesteht, wenn die weitere Zufuhr dieses "Regenerationsfaktors" unterbrochen wird.

TABELLE 1: Mittelwerte der $P^{32}O_4$-Aktivität von je 21 Leberexplantaten (Impulse / min.)

Versuch	In parabiotischer Vereinigung: Teilhepatektomierte Ratte (I a)	In parabiotischer Vereinigung: Unbehandelte Ratte (I b)	Kontrolle: Mittelwert aus je 2 unbehandelten Parabioseratten	Aktivitätssteigerung (I b) gegen Kontrolle
I	502	363	225	+61 %
II	486	340	311	+ 9 %
III	697	390	299	+30 %
IV	474	441	227	+94 %

II. WIRKUNG VON ORGANHOMOGENAT AUF ORGANEXPLANTATE

α) Auf Leberexplantate:

1. Wirkung von normalem Leberhomogenat und Homogenat regenerierender Leber auf embryonale Leberexplantate.

Im Serum teilhepatektomierter Ratten war der Regenerationsfaktor von verschiedenen Autoren bewiesen worden. Ob dieser Faktor sich auch an seinem Wirkungsort der Leber wiederfindet, versuchten wir zu klären, indem wir Leberhomogenat aus regenerierender Leber dem Nährmedium von Explantaten zusetzten.

Zu diesem Zweck wurden normale Lebern und regenerierende Lebern (48 Stunden nach Teilhepatektomie) homogenisiert und ultrazentrifugiert, der Überstand dann auf die in der Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen verdünnt und den Organkulturen zugesetzt. In den Versuchen 8 - 18 wurde das Homogenat 1 - 20 min mit Anwendung des unter B VI b ausgeführten Kunstgriffes erhitzt. In den Versuchen von WRBA und Mitarbeitern gelang nämlich der Nachweis der Thermostabilität des Regenerationsfaktors nur durch Anwendung dieser Methode. (Tab. 2 a-c u. Kurvenblatt 1)

a) In allen Versuchen, in denen die Wirkung von Organhomogenat auf Explantate untersucht wurde, konnten wir (wie aus den Kurvenblättern 1 und 2 hervorgeht, in denen wir der besseren Übersicht halber nur einige Kurven wiedergegeben haben), mit Zunahme der Homogenatkonzentration in der Kultur eine Abnahme des Einbaus von $P^{32}O_4$ im Vergleich zum Hanks-Kontrollwert, nachweisen. (Im Hanks-Kontrollversuch wurde die sonst zugesetzte Homogenatmenge durch Hanks-Salzlösung ersetzt). Hohe Homogenatkonzentration hemmt also die Phosphataufnahme. Die Ursache dieses Effektes glaubten wir darin gefunden zu haben, daß möglicher-

TABELLE 2 a :

H mg	N 0,257	H mg	N 0,514	H mg	N 1,285	H mg	N 2,57	H mg	N 6,4	H mg	N 12,85	H mg	N 17,1	H mg	N 25,7	H mg	N 64	H mg	N 12,5	H mg	N 214	H mg	N 240	H mg	N 257	H mg	N 428	Konz. / Vergleich	Gew. von 18 Expl.	Länge des Explantatspenders	Erhitzungsdauer	Versuch
												285	451			305	319	275	258	280									16,4 mg	1,3 cm langer Embryo	ungekocht	1
						267	294							267	301							326	296					266	16,95 mg	0,9 cm langer Embryo	ungekocht	2
														240	266			255	256							217	227	287	11,2 mg	3 cm langer Neugeb.	ungekocht	3
						88	77							84	93			59	70							52	54	78	14,1 mg	"	ungekocht	4
				228	206			201	224	231	221					202	192											265	18,5 mg	"	ungekocht	5
						214	201							231	203											164	132	153	15,36 mg	"	ungekocht	6
		190	174											174	144									169	146	148	122	201	19,55 mg	"	ungekocht	7
						465	435							363	449											234	206	457	23,5 mg	3 cm langer Embryo	1 min. erh	8
398	436					475	429																			337	366	307	17,85 mg	"	5 "	9

TABELLE 2 b :

(E : Ultrazentrifugensediment L : Lipoidhäutchen)

Zentrifugensediment (2,4 g in 1 ml Hanks-Salzlösung). Davon verteilt auf 4 ml Medium:

0,01 Tropfen 0,1 " 1 " 2 " 10 "

										347	126			261	156			97	161									255	19,5 mg	3 cm langer Embryo	2 min. erh.	10
800	776			769	855					721	722																	711	15,0 mg	1,5 cm langer Embryo	20 "	11A
775				749						709																			"	"	20 "	11B
				235	231					367	315							81	170									226	21,3 mg	3 cm langer Neugeb.	20 "	12
				278						318								89											21,3 mg	"	20 "	13

TABELLEN 2 a - c :

Normalleberhomogenat (N)
Homogenat regenerierender Leber (H)

in Tabelle 2a: Verwendung des Zentrifugenüberstandes des Homogenats.

in Tabelle 2b: Verwendung von Zentrifugenüberstand und Lipoidhäutchen

in Tabelle 2c: Verwendung des rohen, nicht zentrifugierten Homogenats.

TABELLE 2 c :

H mg	N 2,57	Konz. / Vergleich	Gewicht von 18 Explantaten	Erhitzungsdauer	Versuch
			12 mg	5 min. erh.	14A
355	292		20,8 mg	"	14B
287	269	556	15,7 mg	"	15A
537	624	303	13,8 mg	"	15B
267	224		21,75 mg	7 min. erh.	16
454	416		19,20 mg	10 "	17
267	328		22,20 mg	5 min. erh.	18

weise im nativen Homogenat noch stoffwechselfähige Systeme enthalten sind, die das Phosphat aufnehmen, das den Explantaten bei hohen Homogenatkonzentrationen somit fehlt.

Diese Deutung erwies sich als nicht zutreffend:

1.) In den Versuchen 8-18 wurde das Homogenat bis zu 20 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, was jede eigene Stoffwechselaktivität des Homogenats mit Sicherheit zerstörte.
2.) Auch das suspendierte Eiweiß trägt keine bedeutende Menge von Aktivität an seiner Oberfläche.

Das zeigt folgender Versuch: Kulturen mit üblichen Homogenatkonzentrationen wurden ohne Explantate für 20 Std. inkubiert. Danach teilten wir den Röhrcheninhalt in 2 gleiche Hälften für A und B. Die Röhrcheninhalte von B wurden dann 15 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt.

Beide Reihen zentrifugierte man nun 10 Minuten lang bei 6000 U/min. Der Überstand wurde abpipettiert und das restliche Eiweiß mit je 1,6 ml 25 %iger Trichloressigsäure ausgefällt. Überstand und Eiweißproben wurden auf Schälchen gegeben, getrocknet und auf ihre Aktivitäten gemessen.

In der Tabelle C wird eine Bilanz der Verteilung des der Kultur zugesetzten $P^{32}O_4$ gemacht. Das ganze im Medium befindliche Eiweiß wurde dabei mit Trichloressigsäure ausgefällt und nachher abzentrifugiert. (Von den 4 ml des Restmediums wurde jeweils 1 ml gemessen und die Aktivität mit 4 multipliziert).

Wie die Tabellen zeigen, ist die Gesamteiweißaktivität im Vergleich zur Aktivität im restlichen Medium so gering, daß man sie vernachlässigen kann.

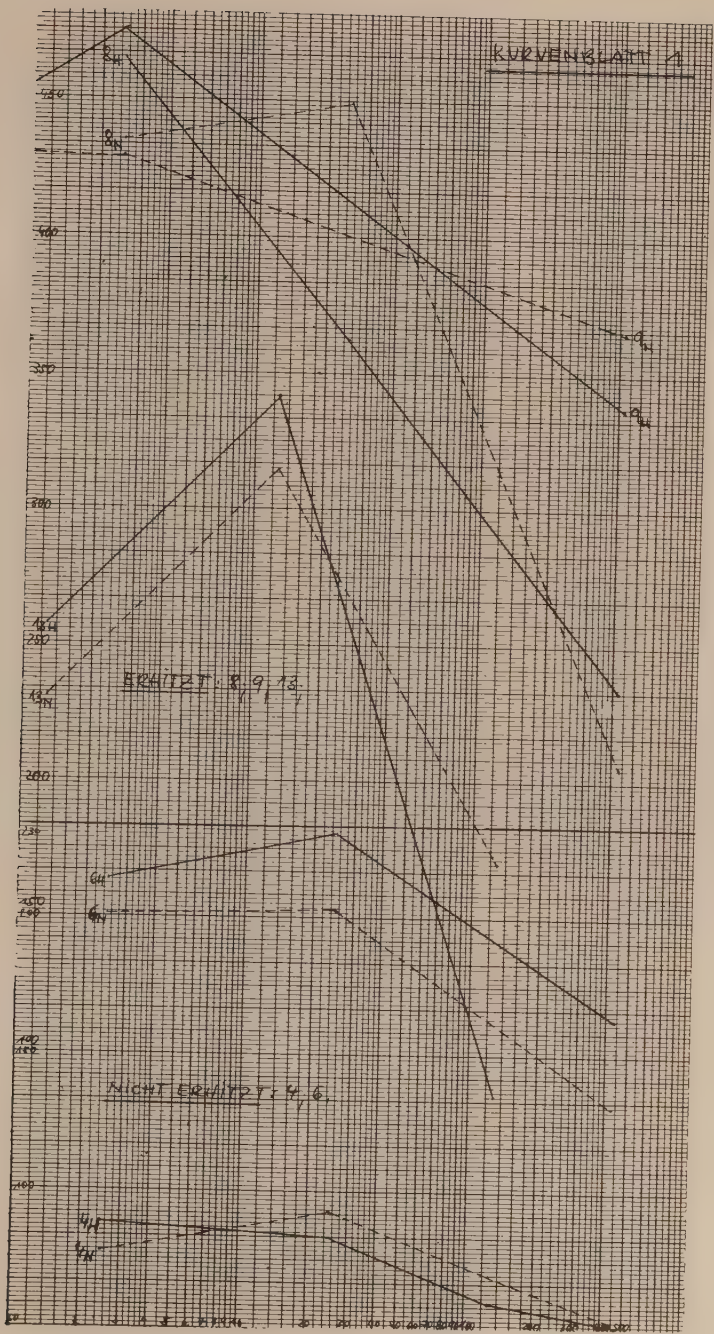
Eine Konkurrenz zwischen Homogenat und Explantaten um die in der Kultur enthaltene Phosphataktivität scheidet damit aus.

b) Die Kurven, (normales Homogenat gestrichelt und Hepatektomiehomogenat ausgezogen) verlaufen in den meisten Versuchen nahezu parallel.

c) Erhitzen der Homogenate im kochenden Wasserbad (Versuch 8 - 13) ergibt in allen Versuchen wesentlich steiler verlaufende Kurven. Die absoluten Aktivitätswerte liegen außerdem immer wesentlich höher als bei nicht erhitztem Homogenat.

d) Im Durchschnitt liegen die Impulszahlen der Explantate, die mit Homogenat aus regenerierender Leber inkubiert worden waren über den Vergleichswerten, die Normalleberhomogenat liefert. Dieses Ergebnis ist auch aus dem Kurvenblatt 1 ersichtlich: Die Kurven für Homogenat aus regenerierender Leber liegen in der Mehrzahl der Versuche über denen für Normalleberhomogenat.

In den Versuchen 10 - 13 wurde Ultrazentrifugensediment (E) (2,4 g in 1 ml Hanks suspendiert) oder das Lipoidhäutchen (L), das sich als Deckel auf dem klaren Überstand abscheidet oder ein Gemisch aus beiden, in verschiedenen Konzentrationen in Form von Tropfen den Explantaten zugesetzt.


KURVENBLATT 1
ERHITZT: 8, 9, 13.
NICHT ERHITZT: 4, 6.

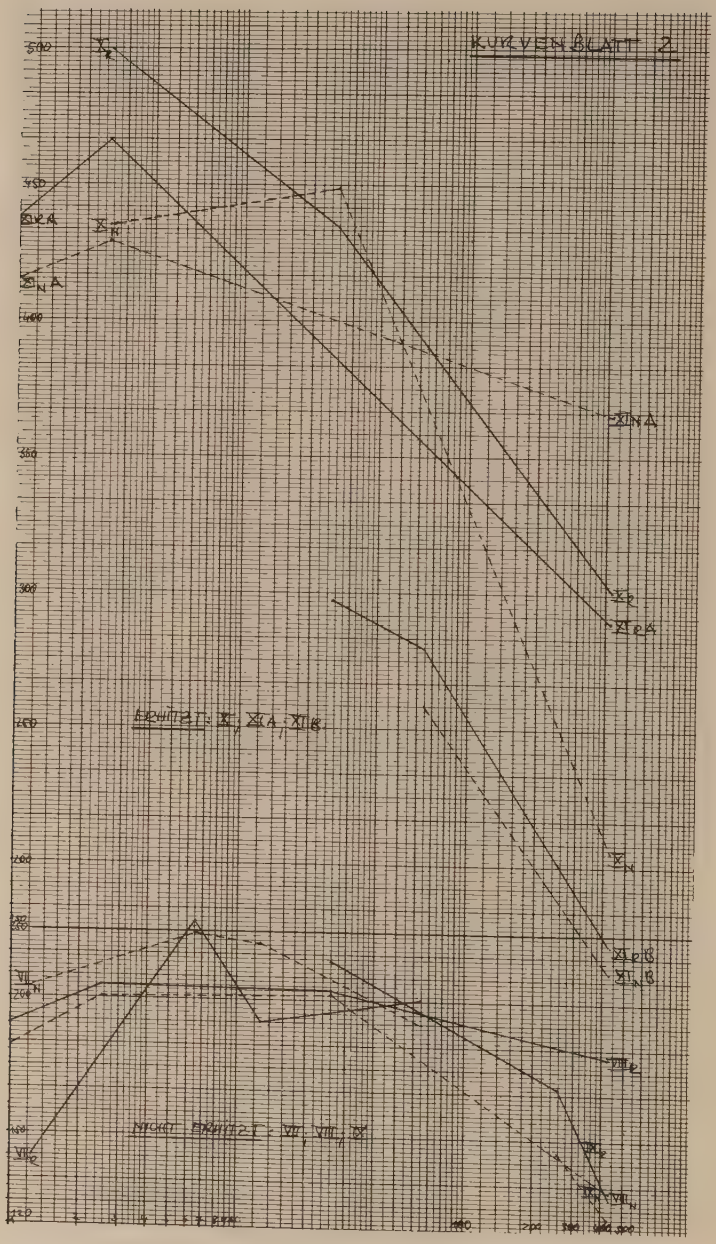
Homogenatsorte:	Homogenatkonz. im Medium:	A				B				C				
		Homogenat - Eiweiß	Mit Trichloressigsäure ausgefälltes Eiweiß	Gesamt - Eiweiß	Rest - Medium	Homogenat - Eiweiß + durch Erhitzen ausgefälltes Eiweiß	Mit Trichloressigsäure ausgefälltes Eiweiß	Gesamt - Eiweiß	Rest - Medium	Homogenatkonz. im Medium:	Aktivität der Explantate	Mit Trichloressigsäure ausgefälltes Eiweiß	Rest - Medium	S u m m e
N	42,8 mg	1565	3510	5075	170950	7010	2004	9014	166400		6223	12184	167668	186075
H		2148	2611	4759	152010	4608	1787	6095	142700		5699	14789	170964	191452
R		1646	1840	3536	163340	6054	1041	7095	154400		5054	12501	173064	190619
N	25,7 mg	1888	4810	6698	168585	3901	1401	5302	134200		7505	10403	167792	185700
H		1640	2063	3703	146265	5221	1882	7103	165900		8323	11015	172568	191906
R		2304	2360	4664	151260	3285	1291	4576	141900		7935	9770	170844	188549
N	2,57 mg	1887	1829	3716	150460	1395	1603	2998	165400		7431	10562	164552	182548
H		1630	1699	2729	132755	1247	1392	2639	166400		7492	9872	167152	184516
R		2105	1736	3841	184700	1758	1325	3083	175400		6759	11494	155104	173357

TABELLE 3 A - C

N : Normalleberhomogenat
H : Hepatektomiehomogenat
R : Renektomieleberhomogenat

Versuch:		VII	VIII	IX	X	XI A		XI B
Erhitzungsdauer					1 min. erh.	5 min. erh.		2 min. erh.
Länge des Explantatspenders		4 cm langer Neugeb.	3 cm langer Neugeb.	"	"	3 cm langer Embryo		3 cm langer Embryo
Gewicht von 18 Explantaten		18,5 mg	15,35 mg	19,55 mg	23,5 mg	17,85 mg		19,5 mg
Vergleich / Konz.		221	153	201	457	307		255
N	428		132	122	206	366	10	161
R	mg		180	130	301	287	Tropfen dem Medium zugesetzt.	171
N	257			146				
R	mg			169				
N	64	192						258
R	mg	201						279
N	25,7		203	144	449		1 2	126
R	mg		204	214	435		Tropfen	297
N	12,85	221						
R	mg	192						
N	6,4	224						
R	mg	228						
N	2,57		201		435	429		
R	mg		205		500	466		
N	1,28	206						
R	mg	142						
N	0,514		174					
R	mg		191					
N	0,257					436	Vom Zentrifugenrückstand :	
R	mg					402		

TABELLE 4: Leberhomogenat von Ratten 44 Stunden nach Renektomie (R) und von unbehandelten Ratten (N) auf embryonale - und Neugeborenenexplantate in verschiedenen Konzentrationen.


KURVENBLATT 2
500
450
400
350
300
250
200
150
120
ERHITZT: X, XIA, XIB
NICHT ERHITZT: VII, VIII, IX
400
200
300
400
500

e) Zwischen den Ergebnissen in Versuchen 1 - 9, in denen der Ultrazentrifugenüberstand verwendet wurde, und den Versuchen 14 - 18, in denen nicht zentrifugiertes Homogenat den Kulturen zugesetzt wurde, läßt sich kein signifikanter Unterschied finden.

f) Es gibt für die Quantität der Phosphatassimilierung in den Explantaten optimale Homogenatkonzentrationen: Die Konzentration liegt für nicht erhitztes Homogenat bei 25 mg Leber pro 4 ml Medium und für erhitztes Homogenat bei 2,5 - 13 mg Leber pro 4 ml Medium.

2. Wirkung von Homogenat aus Lebern von Ratten 44 Stunden nach Renektomie im Vergleich zu normalem Leberhomogenat.

Um einen besseren Vergleichswert für die Hepatektomieversuche, als den der Normalleberaktivität zu bekommen, wählten wir einmal Leberhomogenat von Ratten, die 44 Stunden vorher einseitig renektomiert worden waren.

Dieses Homogenat steigerte den Phosphateinbau in Neugeborenenleberexplantate wesentlich mehr als Homogenat regenerierender Lebern. Wie aus der Tabelle 4 zu ersehen ist, bestätigte sich dieses Ergebnis mehrmals.

Die Ergebnisse und Folgerungen, die unter 1, a - f für die Hepatektomieleber aufgeführt wurden, scheinen dem Kurvenverlauf zufolge auch für die Leber zu gelten, die aus einer einseitig renektomierten Ratte stammt. Die optimale Konzentration von ungekochtem Homogenat aus dieser Leber liegt allerdings hier zwischen 6 und 7 mg/4 ml Medium und von gekochtem zwischen 2 und 3 mg/4 ml Medium.

3. Wirkung von Homogenat aus Lebern von Ratten, 54 Stunden nach Darmunterbindung und 54 Std. nach i. p. Injektion von Pyrifer.

Wir haben erfahren, daß nicht nur Teilhepatektomie, sondern auch einseitige Nephrektomie (diese sogar in verstärktem Maße) in der Leber der Versuchstiere das Auftreten eines stoffwechselsteigernden Faktors bewirkt.

Nun fragten wir uns, ob auch andere unspezifische Eingriffe in den Organismus einen solchen Vorgang auslösen können. In Tabelle 5 finden sich die Ergebnisse zweier Versuche aufgeführt:

Im Versuch 1 verglichen wir die Wirkung von Leberhomogenat von Ratten, bei denen 54 Stunden vorher das colon ascendens unterbunden worden war, mit der von normalem Leberhomogenat. Das Ileusleberhomogenat bewirkte in 3 Ansätzen eine massive Stoffwechselsteigerung.

In Versuch 2 ist die Wirkung einer intraperitonealen Injektion von 125 E Pyrifer 54 Std. vor dem Experiment nicht eindeutig.

4. Auf der weiteren Suche nach einem brauchbaren Vergleichswert, untersuchten wir in einem Versuch die Wirkung von Herz-, Nieren- und normalem Leberhomogenat im Vergleich zu Hankslösung in 2 verschiedenen Konzentrationen auf embryonale Leber. (Hanks-Salzlösung in normaler Konzentration und 1/10 normaler

Versuch	Erhitzungsdauer in min.	Gew. von 18 Explantaten	Konz. / Hanks	2,57 mg Leber/4 ml Medium							
				nicht erhitzt		5 min. erhitzt					
				N	I	N	I	N	I	N	I
1	5	17,6 mg	565	313	770	552	794	651	557	537	655
						N	R	N	P	N	P
2	5	18,45 mg	5270			8070	8360	5730	5990	6687	6600

TABELLE 5

Homogenat von	Norm. Leber				Herz				Niere				Hanks-Salzlösung	
erhitzt - nicht erh.	erh.		nicht erh.		erh.		nicht erh.		erh.		nicht erh.			
Konz.: mg/4 ml	25,7	2,57	25,7	2,57	25,7	2,57	25,7	2,57	25,7	2,57	25,7	2,57	nK	1/10K
Aktivität/mg	600	351	509	299	546	418	568	476	279	431	465	509	585	385

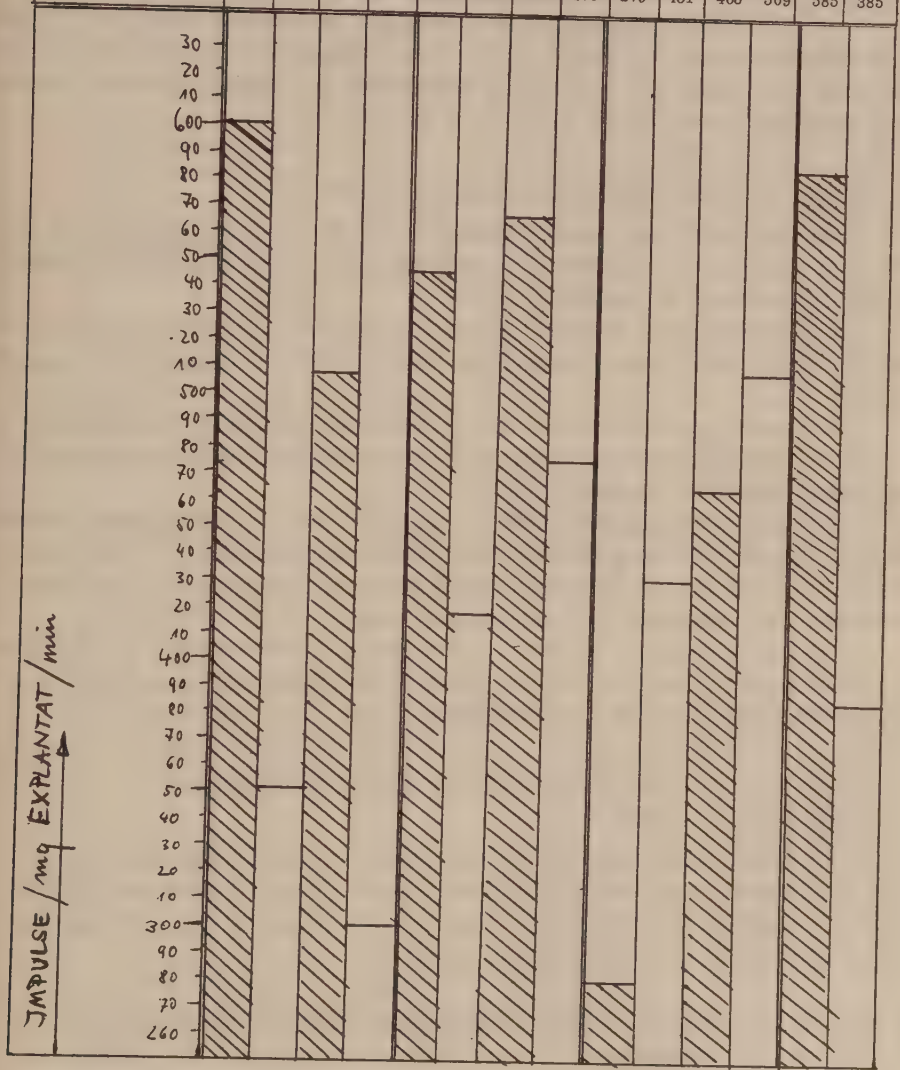


TABELLE 6

Konzentration).

Aus Tabelle 6 mit Säulendiagramm sind folgende Ergebnisse abzulesen:

a) Hankslösung stellt in physiologischer Konzentration ein gutes Vergleichsmedium dar.

b) Gekochtes Leberhomogenat liefert im Gegensatz zu Herz- und Nierenhomogenat höhere Aktivitäten als ungekochtes.

c) Die niedrige Konzentration (2,57 mg/4 ml Medium) liefert nur bei Nierenhomogenat höhere Aktivitäten als die 10-fach höhere (25,7/4 ml Medium). Bei Leber und Herz finden sich umgekehrte Verhältnisse (bei Leber befinden wir uns auf dem abfallenden Schenkel der Kurve aus II.α) 1)

β) Wirkung von Organhomogenaten auf Tumorexplantate

Über den Einfluß des "Regenerationsfaktors", der nach Teilhepatektomie auftritt, auf Tumorgewebe wurden bei wechselnder Versuchsanordnung von mehreren Autoren unterschiedliche Ergebnisse berichtet.

So STASNEY, PASCHKISS [13], Cantarow und Moris: In vivo wird Hepatom- und Walker-Tumorwachstum durch Hepatektomie gefördert, Lymphsarkom dagegen nicht.

1960 berichteten WRBA und RABES [14] über die spezifische Hemmwirkung von Serum teilhepatektomierter Ratten auf den Stoffwechsel von in vitro suspendierten Walker-Carcinom-Ascites-Tumor.

Das gleiche Serum bewirkt auch im Nährboden von Kulturen solider Tumoren eine signifikante Hemmung der Aufnahme markierten Phosphates [15]. Nur Zellen des Ehrlich'schen Mäuse-Carcinom-Ascites zeigen bei Inkubation mit Hepatektomieserum eine Steigerung des Phosphateinbaus um 10 - 27 % [16] [17].

Nachdem wir nun die Wirkung verschiedener Organhomogenate auf embryonale Leberexplantate untersucht hatten, schien es uns interessant, ihren Einfluß auf suspendierte Tumorexplantate zu untersuchen.

1) Wirkung von Normal-(N) und Hepatektomie-(H) Leberhomogenat auf explantierten Tumor

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß Homogenat regenerierender Leber in stets gleicher Konzentration von 2,57 mg Leber in 4 ml Medium (erhitzt und nicht erhitzt den Phosphateinbau in Tumorexplantate im Vergleich zu Normalleberhomogenat) in der Mehrzahl der Versuche steigert.

2) Wirkung von Nierenhomogenat von normalen (N) und renektomierten (RR) Ratten auf Tumorexplantate

(Tabelle 8) In Analogie zum vorigen Versuch zeigt auch Nierenhomogenat, hergestellt aus der nicht entfernten Niere 30 Stunden nach einseitiger Nephrektomie, einen gering steigernden Einfluß auf den Einbau von radioaktivem Phosphat

Versuch	Impftumorart und dessen Alter	Gewicht von 18 Expl.	Erhitzungsdauer	Hanks-vergl.	2,57 mg N	2,57 mg H
1	CR 80 27 Tage alt	20,5 mg	nicht erh.	2035	1775	2122
			7 min. erh.		1283	1587
2	RS 93 34 Tage alt	17,5 mg	nicht erh.	1852	2425	2190
			8 min. erh.		2284	2303
3	RS 95 30 Tage alt	21,4 mg	nicht erh.	1005	978	865
			8 min. erh.		983	976
			nicht erh.		912	1173
			8 min. erh.		1018	906
4	CR 84 35 Tage alt (+100 γ Colchicin)	18,5 mg	nicht erh.		1676	1671
			8 min. erh.		998	1111
			nicht erh.		1217	1452
			8 min. erh.		1154	1440
5	RY 83 28 Tage alt	19,1 mg	nicht erh.	1548	1523	1545
			8 min. erh.		1780	1510
			nicht erh.		1451	1536
			8 min. erh.		1606	1756
	2 verschiedene Konzentrationen des Homogenatzusatzes:			Konz:		
6	RS 96 22 Tage alt	20,5 mg	nicht erh.	25,7 mg	1469	1735
			5 min. erh.		1720	1864
			nicht erh.	2,57 mg	1742	1811
			5 min. erh.		1791	1929

TABELLE 7

Versuch	Impftumor und dessen Alter	Gewicht von 18 Expl.	Erhitzungsdauer	Hanks-vergl.	Konz. N	2,57mg RR
1	RY 84 22 Tage alt	18,95 mg	nicht erh.		2670	2955
			5 min. erh.		2845	3001
			nicht erh.		2360	2850
			5 min. erh.		2610	2508
2	RY 85 22 Tage alt	21,0 mg	nicht erh.		1163	1030
			5 min. erh.		1108	1458
			nicht erh.		1575	1384
			5 min. erh.		1624	1709

TABELLE 8

in Tumorexplantate. Zu den Ergebnissen, die in 1) und 2) dargelegt wurden, läßt sich noch sagen, daß die verwendeten Tumorarten unter Organhomogenatzusatz keinen signifikanten Unterschied ihrer Phosphorylierungsaktivitäten liefern.

III. WIRKUNG VON HYPOPHYSENHOMOGENAT VORBEHANDELTER UND NORMALER RATTEN AUF ORGANEXPLANTATE

Wir untersuchten Hypophysenhomogenat von Tieren, in denen durch vorangehende Organresektionen Regenerationsvorgänge in Gang gebracht worden waren, in seiner Wirkung auf Organexplantate.

Zu diesem Zwecke wurden Ratten 48 Stunden nach Teilhepatektomie oder 72 Stunden nach einseitiger Renektomie getötet und entblutet. Die Herstellung von Hypophysenhomogenat ist unter B VIII beschrieben.

1.) Wirkung von Hypophysenhomogenat von normalen Ratten und solchen, die vor 48 Stunden teilhepatektomiert worden waren auf Explantate neugeborener Rattenleber:

Die Homogenate wurden teils nach früher angegebener Methode, mit der die Eiweiß-Ausfällung verhindert wird, im siedenden Wasserbad erhitzt, teils blieben sie unerhitzt. Erhitzen hat, wie aus den Tabellen hervorgeht, keinen signifikanten Einfluß auf die Wirkung des Homogenats. Unter Berücksichtigung der Homogenatkonzentrationen erhält man folgende Ergebnisse:

Bei der Konz. von	1/2	Hypophyse	/4 ml	Medium:	+20,35 %
" " " "	1/4	"	/4 ml	" :	+ 5,48 %
" " " "	1/20-1/40	"	/4 ml	" :	- 2,3 %
" " " "	1/200	"	/4 ml	" :	- 7,96 %

Die Prozentzahlen geben Steigerung oder Hemmung der Phosphatassimilierung in den Explantaten wieder, die durch Hypophysenhomogenat von Leber-regenerierenden Ratten hervorgerufen werden (im Vergleich zu normalem Rattenhypophysenhomogenat).

2.) (Tabelle 10) Wirkung von Hypophysenhomogenat von normalen Ratten (NHy) und solchen, die vor 72 Stunden renektomiert (RHy) worden waren auf Explantate aus Neugeborenen-Rattenleber.

3.) (Tabelle 11) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten (NHy) und solcher Ratten, die vor 48 Stunden hepatektomiert worden waren (HHy) auf Neugeborenen-Rattenleber.

4.) (Tabelle 12) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten (NHy) und solcher Ratten, die vor 48 Std. hepatektomiert (HHy) worden waren auf Neugeborenenrattennierenexplantate.

Versuch	Erhitzungsdauer	Gew. von 18 Expl.		NHy	RHy
1	Homogenatkonz.: 1/2 Hypophyse/4 ml Medium				
	4 min. erhitzt	14 mg	9080	6910	8038
2	Homogenatkonz.: 1/200 Hypophyse/4 ml Medium				
	4 min. erhitzt	14 mg	9080	8930	10130

TABELLE 10

Versuch Nr.	Erhitzungsdauer	Gewicht von 18 Explantaten:	Hanks-vergl. wert	NHy	HHy
	Homogenatkonz.: 1/2 Hypophyse/4 ml Medium				
1A	nicht erhitzt	13,1 mg	7110	5980	6630
1B	3 min. erhitzt	17,75 mg	7040	6880	9240
2	4 min. erhitzt	14,0 mg		6910	7990
	Homogenatkonz.: 1/4 Hypophyse/4 ml Medium				
3A	nicht erhitzt	15,7 mg		8630	10070
3B	"	"		3650	3879
4	7 min. erhitzt	21,75 mg		10020	9840
5	4 min. erhitzt	22,2 mg		6910	8360
6	5 min. erhitzt	16,65 mg	4920	4620	3910
7	nicht erhitzt	"	2271	3253	3466
	Homogenatkonz.: 1/20 Hypophyse/4 ml Medium				
8A	nicht erhitzt	13,1 mg	7110	7640	6990
8B	3 min. erhitzt	17,75 mg	7040	9480	9310
	Homogenatkonz.: 1/200 Hypophyse/4 ml Medium				
9A	nicht erhitzt	13,1 mg	7110	8160	7120
9B	3 min. erhitzt	17,75 mg	7040	10330	8540
10	4 min. erhitzt	14,0 mg	9080	8930	9480
	Homogenatkonz.: 1/40 Hypophyse/4 ml Medium				
11	10 min. erhitzt	19,2 mg		8320	8610

TABELLE 11

	Erhitzungsdauer	Gewicht von 18 Explantaten	Hanks-Vergl.	NHy	HHy
	Homogenatkonz.: 1/2 Hypophyse/4 ml Medium				
1	4 min. erhitzt	11,5 mg	14850	17300	15258
2	7 min. erhitzt	12,5 mg	6575	7150	7765
	3/7 Hypophyse/4 ml Medium				
3	5 min. erhitzt	19,4 mg	16750	20850	21950
4	7 min. erhitzt	19,0 mg		7925	10290
	1/4 Hypophyse/4 ml Medium				
5		20,7 mg		7900	8550
	3/70 Hypophyse/4 ml Medium				
6	5 min. erhitzt	19,4 mg	16750	16050	20500
	1/40 Hypophyse/4 ml Medium				
7	5 min. erhitzt	20,7 mg		8050	7530
	3/700 Hypophyse/4 ml Medium				
8	5 min. erhitzt	19,4 mg	16750	21600	22250
9	7 min. erhitzt	12,5 mg	6575	6840	6925
10	7 min. erhitzt	19,0 mg		10060	10567
	1/200 Hypophyse/4 ml Medium				
11	4 min. erhitzt	11,5 mg	14850	16050	17846

TABELLE 12

5.) (Tabelle 13) Wirkung von Hypophysenhomogenat normaler Ratten (NHy) und solcher, die vor 24 Std. bis 6 Tagen renektomiert (RHy) worden waren auf Nierenexplantate.

Die in 1) aufgezeigte Abhängigkeit der Steigerung des Phosphateinbaues, von der Homogenatkonzentration, die aus Tabelle 11 errechnet wurde, wiederholt sich bei den Versuchsreihen von 2), 4) und 5) mit anderen Homogenaten und Explantaten nicht mehr.

Bei allen Versuchen dieser Art läßt sich kein signifikanter Einfluß auf den Grad der Steigerung der Phosphataufnahme durch Erhitzungsdauerunterschiede und verschiedene Zeitpunkte der Operation nachweisen.

6.) (Tabelle 14) Einfluß anderer Eingriffe in den Organismus von Ratten auf die Bildung eines stoffwechselsteigernden Faktors in der Hypophyse:

Da sowohl Hepatektomie wie Renektomie die Bildung eines die Phosphorylierungsvorgänge fördernden Faktors in der Hypophyse anregt, fragten wir uns, ob nicht jeder stärkere Eingriff in den Organismus des Versuchstieres diesen Vorgang auslöst.

Deshalb wurde für Versuch A eine Operation (O) ausgeführt, in der nach einem langen Bauchschnitt das intestinum mit einer Pinzette stark hin- und herbewegt und

Versuch Nr.	Erhitzungsdauer in min.	Renektomie vor ... Stunden	Gewicht von 18 Explantaten	Hanks-Vergl.	NHy	RHy
	Homogenatkonz.: 1/2 Hypophyse/4 ml Medium					
1	4	24	11,5 mg	14850	17300	16050
	3/7 Hypophyse/4 ml Medium					
2	7	29	12,5 mg	13150	14300	14930
3	7	45	19,0 mg		7925	11250
	1/4 Hypophyse/4 ml Medium					
4	8	6 Tage	18,75 mg	9005	9420	9380
	1/40 Hypophyse/4 ml Medium					
5	8	6 Tage	18,75 mg	9005	9230	7740
	3/700 Hypophyse/4 ml Medium					
6	7	29 Stunden	12,5 mg	13150	13680	12450
7	7	45 "	19,0 mg		10060	10260
	1/200 Hypophyse/4 ml Medium					
8	4	24 "	11,5 mg	14850	16050	16750

TABELLE 13

gezerrt wurde. Sowohl in Versuch A wie in B wurde den Ratten Pyrifer (P) i. p. injiziert (in Versuch A 200 E, in Versuch B 125 E). Für Versuch B wurde bei einer Ratte durch Unterbindung des colon ascendens ein künstlicher Ileus angelegt. Alle Eingriffe geschahen 48 Stunden vor dem Experiment.

In Tabelle A bewirkt der Zusatz von 7 min. lang erhitztem Hypophysenhomogenat einer mit Pyrifer vorbehandelten Ratte eine Aktivitätssteigerung von durchschnittlich +4,07 %. Das Hypophysenhomogenat einer Ratte, die einer einfachen Bauchoperation unterzogen worden war, zeigte eine durchschnittliche Steigerung von +2,67 %. Tabelle B zeigt Depression bei Zusatz von ungekochtem Homogenat.

A	Erhit-zungs-dauer	Gewicht v. 18 Explan-taten		N	P	O	N	P	O	N	P	O
	7 min.	17,5 mg		1/2 Hypophyse			1/20 Hypophyse			1/200 Hypophyse		
	auf Nierenexplantate		15460	15015	15339	15727	16265	16838	16881	15191	16161	15077
B				1/2 Hypophyse/4 ml Medium								
	5 min	19,3 mg		nicht erhitzt			5 min. erhitzt					
				N	P	I	N	P	I			
	auf Leberexplantate		8380	9810	8850	9120	8230	9330	10350			

Tabelle 14

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Wir untersuchten die Wirkung stoffwechselbeeinflussender Faktoren auf Organexplantate in Gewebekulturen. Den Grad der Steigerung oder Hemmung von Stoffwechselvorgängen bestimmten wir durch Zusatz von radioaktivem Phosphat zum Nährmedium. Die Menge des von den Teilchen aufgenommenen $P^{32}O_4$ stellt ein objektives Maß für die während der Kulturdauer abgelaufenen Phosphorylierungsvorgänge innerhalb der Organexplantate dar.

Die große Regenerationskraft der Leber von Nagetieren ist seit langem bekannt. Deshalb ist die Teilhepatektomie eine beliebte Methode zur Bestimmung eines im Zusammenhang mit der Regeneration auftretenden Faktors. Die früher übliche Mitosenzählung zum Nachweis des Regenerationsausmaßes ist seit 1960 (4) durch den weitaus genauer bestimmbaren Einbau radioaktiven Phosphats in Organexplantate verdrängt worden. Die aufgenommene Aktivität wird mit Hilfe von Strahlungsmeßgeräten bestimmt. Dieser "Leberregenerationsfaktor" wurde mit Sicherheit im Blutserum von teilhepatektomierten Ratten nachgewiesen (1) (2) (3) (4) (5) (10).

Einige Autoren (1) (2) konnten sogar zeigen, daß dieses Agens aus einem teilhepatektomierten Parabiosepartner mit dem Blut in die andere Ratte übergeht, um auch in der intakten Leber eine Mitosesteigerung hervorzurufen.
Wir griffen diese Parabioseversuche in folgender abgewandelter Form wieder auf:

Vier Tage nach parabiotischer Vereinigung zweier junger Ratten wurden bei einem Partner zwei Drittel der Leber entfernt. 48 Stunden danach töteten wir beide Tiere. Die Leber beider Tiere wurde explantiert. Zum Vergleich inkubierten wir Teilchen aus Lebern von einem Parabiosepärchen, bei dem keine Teilhepatektomie erfolgt war.

Es zeigte sich, daß sowohl die Explantate aus der regenerierenden Leber als auch die aus der intakten Leber während der 20-stündigen Kulturdauer bedeutend mehr $P^{32}O_4$ einbauten, als die Explantate aus den Lebern des Kontrollpärchens.

Daraus ergibt sich, daß, ganz unabhängig davon, ob der "Regenerationsfaktor" in der regenerierenden Leber oder in einer endokrinen Drüse gebildet wird, sein dauernder Nachschub für die Aufrechterhaltung eines einmal induzierten Wachstumsvorganges nicht unbedingt notwendig ist.

Ein ähnliches Ergebnis hatten HOLEČKOVÁ und POUPA (8) für die Niere geliefert. Sie konnten zeigen, daß nach einseitiger Nephrektomie die explantierte zweite Niere in der Kultur auffallend besser wächst als die normale Niere eines unbehandelten Tieres.

Ob eine Anreicherung des "Faktors" in der Empfängerzelle oder eine langwirkende Stoffwechseländerung in der stimulierten Zelle stattfindet, bleibt dabei offen.

Mit der nächsten Versuchsreihe bemühten wir uns zu klären, ob sich dieser "Faktor" in seinem Erfolgsorgan der Leber nachweisen läßt.

Zu diesem Zweck verglichen wir Homogenat aus regenerierender Rattenleber

mit normalem Leberhomogenat in ihrer Wirkung auf embryonale und Neugeborenen-Leberexplantate. Dabei diente uns der Phosphateinbau in die Leberteilchen als Indikator für den Grad der Stoffwechselbeeinflussung. Wir verwendeten die Organe junger Individuen, da sie sich noch durch besonders große Stoffwechselaktivität auszeichnen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden in der Folge dargelegt und diskutiert:

Verschiedene Konzentrationen des zugesetzten Homogenats ergeben Änderungen in der Inkorporation aktiver Substanz durch die Explantate. Diese Ergebnisse lassen sich in Form von Kurven darstellen. Diese Aktivitätskurven sind bei verschiedener Konzentration des Homogenatzusatzes nicht deckungsgleich. Die Ursache dafür ist darin zu suchen, daß es möglich ist, die Bedingungen für alle Versuche vollständig gleich zu halten. So mußten die Organexplantate einmal aus embryonalen - ein ander Mal aus neugeborenen Ratten gewonnen werden. Es stellte sich heraus, daß embryonale Leberexplantate viel unregelmäßiger als solche aus Neugeborenenlebern $P^{32}O_4$ einbauen; wahrscheinlich deshalb, weil (wie man mikroskopisch leicht erkennen kann) sie noch im Dienste der Haemopoese stehen.

Außerdem war es technisch nicht möglich, der Kultur exakt gleich große $P^{32}O_4$-Aktivitäten in allen Versuchen zuzugeben, auch bei Berücksichtigung der Halbwertszeiten. Es stellte sich heraus, daß es optimale Leberhomogenatkonzentrationen für den $P^{32}O_4$-Einbau in Explantate gibt. Diese Konzentration liegt für nicht erhitztes Homogenat bei 25 mg. Leber pro 4 ml Medium und für erhitztes Homogenat bei 2,5-13 mg Leber pro 4 ml Medium. Hohe Homogenatkonzentrationen bewirken eine Depression der Phosphorylierung im Explantat im Vergleich zu Kontrollkulturen, in denen das Homogenat durch gleiche Menge Hanks-Salzlösung ersetzt worden war.

Es läßt sich zeigen, daß diese Kurven nicht dadurch vorgetäuscht werden, daß Homogenat in Konkurrenz mit den Explantaten um das zugesetzte $P^{32}O_4$ tritt:

Bis zu 20 Minuten in siedendem Wasserbad erhitztes Homogenat liefert als Zusatz zum Medium höheren Phosphateinbau als nicht erhitztes.

Nach 20 Stunden Inkubation wurde die gesamte im Nährmedium und Homogenat enthaltene hochmolekulare Substanz durch Erhitzen und Trichloressigsäureextraktion ausgefällt. Die im Sediment enthaltene Aktivität erweist sich als verschwindend gering. Nahezu die gesamte Radioaktivität findet sich im Filtrat wieder.

Der Zusatz von Homogenat aus normaler und aus regenerierender Leber ergibt nahezu gleiche Phosphataufnahmen, so daß die Kurven für die meisten Versuche fast parallel verlaufen. Gäben sie tatsächlich die Wirkung des "Regenerationsfaktors" wieder und nicht (wie es wahrscheinlicher ist) die Resultanten verschiedener Stimulierungs- und Depressionswirkungen in der Leber vorhandener Substanzen, so würde dies bedeuten, daß der "Regenerationsfaktor" auch in normaler Leber in unwirksamer Form vorhanden ist. Nur seine Konzentrationsänderung oder seine plötzliche Freisetzung aus einem unwirksamen Komplex würde dann bei Verminderung des Leberparenchyms durch Teilhepatektomie oder durch Zugrundegehen von Leber-

zellen die Regeneration einleiten.

Wenn man das Homogenat in siedendem Wasserbad erhitzt, so mißt man erhöhte Impulszahlen der Explantate im Vergleich zu den Impulszahlen solcher Organteilchen, die mit nativem Homogenat explantiert waren.

Trägt man diese Zahlen in Kurven auf, so sieht man, daß die Kurvenmaxima bei der optimalen Konzentration bedeutend höher liegen und der Kurvenverlauf steiler ist als bei nicht erhitztem Homogenat. Es scheint so, als ob die Kurven für nicht erhitztes Homogenat durch thermolabile Substanzen maskiert seien, und deshalb die Kurven für erhitztes Homogenat die Wirkung des thermostabilen "Regenerationsfaktors" getreuer widerspiegeln [10]. Ob unser thermostabiler Faktor aus Rattenleber mit jenem aus Taubenleber, von dem BRANDT und SEITZ [12] berichten, identisch ist, bleibt offen.

Sie hatten einen, die Fettsäuresynthese von Fermentsystemen in hohem Maße steigernden Faktoren erhalten, indem sie Ultrazentrifugensediment von Taubenleberhomogenat 10 - 30 min im siedenden Wasserbad erhitzten.

Der Verlauf der Phosphatassimilierung für Homogenatzusatz aus regenerierender Leber liegt in den meisten Fällen ganz oder teilweise über dem für den Zusatz von Normalleberhomogenat. Es scheint also unter bestimmten Bedingungen in regenerierender Leber der "Regenerationsfaktor" nachweisbar zu sein.

WRBA und GIESSLER [11] veröffentlichten kürzlich Versuche, in denen sie durch viermalige intraperitoneale Injektion von normalem Rattenleberhomogenat und von Homogenat aus regenerierender Leber (bereits in wesentlich geringerer Konzentration) eine signifikante Steigerung des Einbaus von $P^{32}O_4$ in die Leber der Versuchstiere nachweisen konnten. Damit findet unser Ergebnis, das in vitro erhalten wurde, seine Bestätigung in vivo.

Lebern regenerieren nach Teilhepatektomie. Einseitige Nephrektomie verursacht eine vikariierende Hypertrophie der anderen Niere [8]. Die Reize dazu sind wahrscheinlich in beiden Fällen humoraler Art.

Daher untersuchten wir vergleichsweise nicht Nierenhomogenat von einseitig nephrektomierten Ratten (44 Stunden nach Renektomie), sondern Homogenat aus der Leber solcher Tiere. Damit wollten wir prüfen, ob auch die Parenchymverminderung eines anderen Organes das Auftreten eines stoffwechselstimulierenden Faktors in der Leber bewirkt. Leberhomogenat renektomierter Ratten 44 Std. nach Renektomie fördert den Phosphateinbau in Leberexplantate in wesentlich höherem Maße als normales Leberhomogenat oder sogar Homogenat regenerierender Leber.

Nicht nur die Reduzierung von Leber- oder Nierengewebe, sondern auch ein unspezifischerer Eingriff, wie die Anlegung eines Ileus (54-stündige Unterbindung des colon ascendens) bewirkt das Auftreten eines stoffwechselstimulierenden Faktors. Wir erhielten in diesem Ileusversuch sogar eine Förderung von durchschnittlich 49,3 %.

Einschränkend ist hier aber zu bemerken, daß sowohl einseitige Nephrektomie als auch die Aufhebung der Darmpassage für eine bestimmte Zeit keinen so

spezifischen Eingriff wie die Teilhepatektomie für die Leber darstellen.

WRBA und BOQUOI konnten nämlich eine Steigerung des $P^{32}O_4$-Einbaus in Rattenlebern nach Injektion von Lebergiften intra vitam nachweisen. So könnte auch die Stoffwechselsteigerung in unseren Experimenten ihre Ursache in der Lebertoxizität von Substanzen haben, die nach Darmunterbindung einseitiger Nephrektomie oder Pyriferverabfolgung frei werden.

Dies läßt einen organunspezifischen Faktor vermuten, der wahrscheinlich keine besondere Antwort auf Renektomie darstellt, sondern anscheinend nach jedem unspezifischen, die Leber belastenden Eingriff in diesem Organ auftritt.

Dem Nährmedium von Gewebekulturen, in denen Impftumoren explantiert waren, wurde sowohl Homogenat aus regenerierender Leber, als auch Homogenat aus der Restniere (30 Stunden nach einseitiger Nephrektomie) und $P^{32}O_4$ zugesetzt. Beide Homogenate bewirken in der Mehrzahl der Versuche eine Förderung des Phosphateinbaus in die Tumorexplantate im Vergleich zu normalem Leber- und Nierenhomogenat. Das starke Schwanken der Werte ist dadurch bedingt, daß es praktisch unmöglich ist, Tumorexplantate zu gewinnen, die sich unter gleichen Stoffwechselbedingungen befinden. Obwohl die Explantate nur aus Tumorrandteilchen geschnitten wurden, die makroskopisch intakt aussahen, ist es doch sehr wahrscheinlich, daß Teilchen mitinkubiert waren, von denen einzelne Zellen oder Zellbezirke bereits in Degeneration begriffen waren, oder schon der Nekrose verfallen.

Es ist nicht klar, wo dieser stoffwechselsteigernde Faktor gebildet wird. In der Literatur [18] wird von Experimenten berichtet, in denen bei hypophysektomierten Ratten durch Injektion von somatotropem Hormon und Hypophysenextrakt und durch ein Gemisch aus beiden mit Cortison eine Steigerung der Mitosenrate in der regenerierenden Leber erreicht wurde. Diese Ergebnisse zeigten sich nur nach sehr kleinen Injektionsdosen dieser Stoffe. Große Dosen erwiesen sich als toxisch. Die verabreichten Substanzen bewirkten aber nur eine Zunahme der bereits ablaufenden Regenerationsprozesse.

Das läßt uns eine, den Regenerationsvorgang unterstützende Funktion der Hypophyse vermuten. Dieser Annahme entsprechen schon früher zitierte Befunde [19], daß nämlich explantierte regenerierende Leber Phosphat in der gleichen Größenordnung wie embryonale Leber aufnimmt. Auch unsere Ergebnisse über die Persistenz humoral induzierter Wachstumsvorgänge im Explantat bewiesen, daß ganz unabhängig von endokrinen Drüsen einmal intra vitam induzierte Wachstumsvorgänge auch in vitro (zumindest über 20 Stunden) fortbestehen, ohne daß ein dauernder Nachschub von wachstumstimulierenden Stoffen dazu nötig wäre.

Um die Frage nach dem Entstehungsort des "Regenerationsfaktors" weiter zu klären, untersuchten wir Hypophysenhomogenat von teilhepatektomierten, einseitig renektomierten Ratten in seiner Wirkung auf Organexplantate.

Durch Zusetzen von Hypophysenhomogenat von Ratten, 48 Stunden nach Teilhepatektomie oder 72 Stunden nach einseitiger Nephrektomie, zu Organkulturen konnten wir zeigen, daß beide Eingriffe in der Hypophyse das Auftreten eines den

Phosphateinbau fördernden Faktors bewirken. Der $P^{32}O_4$-Einbau wird sowohl in Explantaten aus Leber als auch aus Niere von neugeborenen Ratten stimuliert. Auch unspezifische Eingriffe, wie Pyriferinjektion oder eine Bauchoperation mit Hin- und Herzerren des Intestinums machen einen Faktor solcher Art im Hypophysenhomogenat nachweisbar, wenn auch in sehr geringem Maße.

Werden diese Ergebnisse in weiteren Versuchen bestätigt, so dürfen wir annehmen, daß nicht nur Organteilresektionen, sondern auch andere Eingriffe in den Organismus als eine Art "Stress" wirken, der von der Hypophyse als humoralem Regelzentrum durch Bildung eines die Zellphosphorylierungsvorgänge fördernden Faktors beantwortet wird.

Ob sich das somatotrope Hormon hinter dieser Wirkung verbirgt, wäre zu prüfen, denn seine anabole Wirkung auf den Eiweißstoffwechsel ist seit langem bekannt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1) Explantierte Lebern von Ratten, die mit teilhepatektomierten Ratten parabiotisch vereinigt waren, zeigen auch noch in vitro (für die Dauer von 24 Std. untersucht) eine deutliche Steigerung ihres Stoffwechsels.

2) Die Wirkung von Organhomogenaten auf Organexplantate in der Gewebekultur wurde untersucht:

Sowohl Homogenat aus regenerierender Leber nach Teilhepatektomie als auch Homogenat aus der Leber nach einseitiger Nephrektomie bewirkt im Vergleich zu normalem Rattenleberhomogenat eine Steigerung der Phosphatassimilierung in Explantaten aus junger Rattenleber. (Bestimmt durch Zusatz von $P^{32}O_4$ zum Medium der Gewebekultur)

Auch Homogenat aus der Leber einer Ratte, bei der 54 Std. vorher der Dickdarm unterbunden worden war, zeigt diese Wirkung.

Für das Ausmaß dieser Phosphatstoffwechselsteigerung gibt es optimale Homogenatkonzentrationen. Höhere und niedrigere Konzentrationen als diese bewirken eine Depression des Phosphateinbaus im Vergleich zu Kulturen, denen anstelle von Homogenat isotonische Hanks-Salzlösung zugesetzt wird.

Erhitzung des Homogenats bewirkt in allen Konzentrationen eine Zunahme dieser phosphateinbausteigernden Wirkung.

3) Sowohl Homogenat regenerierender Rattenleber nach Teilhepatektomie, als auch Homogenat aus der Restniere von Ratten nach einseitiger Nephrektomie zeigt in den meisten Versuchen eine geringe Steigerung der Phosphatassimilierung in Tumorexplantaten im Vergleich zu normalem Leber- und Nierenhomogenat. Jedoch sind diese Ergebnisse sehr wechselnd, was wahrscheinlich von der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität in verschiedenen Tumorbezirken herrührt.

4) Hypophysenhomogenat von teilhepatektomierten und einseitig renektomierten Ratten bewirkt bei seinem Zusatz zum Nährmedium im Vergleich zu normalem Rattenhypophysenhomogenat eine Steigerung des Phosphateinbaus in Leberexplantate. Im Falle der teilhepatektomierten Ratten steigert das Homogenat nur in hohen Konzentrationen, in geringen hemmt es sogar den Phosphateinbau.

Die Phosphatassimilierung in Nierenexplantaten wird durch diese Homogenate nicht so eindeutig gefördert.

Auch eine einfache Operation oder eine Darmunterbindung oder sogar eine intraperitoneale Pyriferinjektion macht diesen phosphatstoffwechselsteigernden "Faktor" im Hypophysenhomogenat, wenn auch in geringem Maße, nachweisbar.

Es sei mir zum Schluß meiner Arbeit gestattet, Herrn Professor Dr. Dr. H. WRBA für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Ausführung zu danken.

Weiterhin danke ich besonders Herrn Dr. RABES dafür, daß er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

LITERATURNACHWEIS

1 B. G. Christensen und E. Jacobson: Acta med scand. Suppl. 234, 103-108 (1950)

2 Bucher, N. C. R., J. F. Scott u. J. C. Aub: Cancer Research 11, 157-465 (1951)

3 Friedrich - Freksa, H., u. F. G. Zaki: Z. Naturforschung 9 b, 394-397 (1954)

4 Wrba, H., M. Ripoll - Gómez u. H. Ranz: Exp. Cell. Res. 20, 232-235 (1960)

5 Wrba, H. und Rabes, H.: Naturwissenschaften 48/20, 648 (1961)

6 Pfeiffer, H.: Z. ges. exp. Med. 68, 293 (1929)

7 Wrba, H. und Rabes, H.: Exp. Cell. Res. 26, 62-69 (1962)

8 Holeckova, E. und O. Poupa: Physiol. Bohemoslov. 5, 17-21 (1956)

9 Wrba, H. und Rabes, H.: Z. ges. exp. Med. 133, 316-321 (1960)

10 Wrba, H., Rabes, H., Ripoll - Gómez, M. und Ranz, H.: Exp. Cell. Res. 26, 70-77 (1962)

11 Wrba, H. und Gießler, G.: 50/3 (1963) 96-97 Naturwissenschaften

12 V. v. Brandt und W. Seitz: Klin. Wochenschrift 36. Jahrg. 2. Heft 87-88 (1958)

13 Stasney, Paschkiss, KE., Cantarow und Moris: Acta Unio. internat. contra cancer. 11, 721-724 (1955)

14 Rabes, H. und Wrba, H.: Klin. Wochenschrift 38/24, 1250 (1960)

15 Wrba, H., Ranz, H. und M. Ripoll - Gómez: Naturwissenschaften 47, 447 (1960)

16 Rabes, H. und Wrba, H.: Klin. Wochenschrift 39/4, 206 (1961)

17 H. Wrba, H., Rabes, L. V. Schneider und R. Kageyama: Zeitschrift f. Krebsforschung 64, 278-282 (1961)

18 Hemmingway, I. T. und Cater, D. B.: Nature London 181, 1065-1066 (1958)

19 Wrba, H. und Kalb, H. W.: Naturw. 46, 405 (1959)

LEBENSLAUF

Am 29. Juni 1938 wurde ich als erster Sohn des Elektro- und Spenglermeisters Wilhelm Zintl und seiner Ehefrau Berta geb. Mutterer in Floß in der Oberpfalz geboren.

Von 1944 - 49 besuchte ich die Volksschule in Floß. 1958 bestand ich das Abitur an der Oberrealschule in Weiden.

Anschließend begann ich an der Universität in München das Medizin-Studium, das ich am 17.12.1964 mit dem Staatsexamen beendet habe.